

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-252937

(43)Date of publication of application : 05.10.1993

(51)Int.Cl.

C12N 1/38

A21D 8/04

//(C12N 1/38

C12R 1:225)

(21)Application number : 04-088221

(71)Applicant : YAMAZAKI BAKING CO LTD

(22)Date of filing : 13.03.1992

(72)Inventor : SATO NOBUYUKI

ITO MAKOTO

YOSHIKAWA KEISOKU

(54) PREPARATION OF SOUR SEED AND NUTRIENT MEDIUM FOR LACTOBACILLUS AS A SOUR SEED

(57)Abstract:

PURPOSE: To adjust the sour seed to the stabilized state, so as to cause no sensible change in the activity on subculture, thus facilitating the preparation of the culture medium and attaining good proliferation.

CONSTITUTION: A lactobacillus for sour seed is inoculated in a medium to which cereal flour such as wheat flour, either acetic acid or sodium acetate or both of them are added so that they amount for 0.15 to 0.40wt.%, calculated as acetic acid content. When the subculture with a part of the seed is repeated, on every subculture, acetic acid or sodium acetate or both of them are added. Further, the nutrient culture medium for the lactobacillus as sour seed includes at least 3 nutrient components, namely, 1 to 2wt.%, based on the medium weight, of dried yeast essence, 5ppm to 100ppm of manganese, and 0.05 to 0.40wt.%, calculated as acetic acid, of acetic acid, sodium acetate or both of them.

A05-252937

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] A preparing method of a sour kind which adds both acetic acid, and both [any one sort or / these] so that it may become 0.15 to 0.40weight % as acetic acid content of initiation to a farina culture medium when inoculating lactic acid bacteria for sour kinds into farina culture media, such as wheat flour, and preparing a sour kind.

[Claim 2] It adds so that it may become 0.15 to 0.40weight % to farina culture media, such as wheat flour, as acetic acid content to a farina culture medium in both acetic acid, and both [any one sort or / these], When inoculate lactic acid bacteria for sour kinds, a sour kind is prepared, it plants, inherits and carries out using this sour kind of part and the passage of the culture is repeated and carried out, A preparing method of a sour kind added so that it may plant and may become 0.15 to 0.40weight % as acetic acid content of initiation to a farina culture medium in both acetic acid, and both [any one sort or / these] for every splice.

[Claim 3] In a nutrient medium of lactic acid bacteria for sour kinds used when growing lactic acid bacteria for sour kinds for inoculating a sour kind in pure culture, A nutrient medium of lactic acid bacteria for sour kinds which carry out a dried yeast extract one to 2weight %, make both 5 ppm - 100 ppm, acetic acid, and both [any one sort or / these] acetic acid content for manganese per weight of a culture medium, and contain 0.05 to 0.40weight % of at least three ingredients.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the nutrient medium of the lactic acid bacteria for sour kinds for culture of the preparing method of the sour kind for bread-making, and the lactic acid bacteria for sour kinds.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, it has a great interest in the quality flavor improvement means of a bread, and application of the sour kind is considered as a way stage for it. In a traditional sour kind bread-making method, lactic acid bacteria, yeast, etc. which grew automatically in each climate using the culture medium which used farina, such as wheat flour, were proliferated densely, and this is used as a fermenting seed of a bread. It is said that this sour kind of succession adds the farina and water, such as wheat flour, further based on some sour kinds, and is usually newly fermented -- it plants and is performed by splice operation.

[0003] In these sour kinds of inside, based on microbiological analysis, specific lactic acid bacteria are grown in pure culture, and the example of manufacture of the sour kind which uses this for seed revitalization is known (for example, JP,S57-39734,B printing). Processing desiccation, freeze-drying, etc. as some traditional sour specieses, and enabling preservation and circulation is performed, and the bakery can perform manufacture of sour breads using this.

[0004]

[Problem to be solved by the invention] However, the succession stable only in each specific area is possible for a traditional sour kind, and if this is planted and inherited in a different area, it is known that the sour kind of original activity is lost. This is for receiving the invasion of saprophytic bacteria different from the microorganism which is bearing main roles in each sour kind of fermentation, and if climate climates differ, it will be because the microfloras

in the environment differ.

[0005]Although lactic acid bacteria can be grown in pure culture and the stability of the sour kind first prepared by using this for seed revitalization can be raised, if it plants and the splice is repeated, it will be easy to produce the problem on which the character of a sour kind differs from the beginning by the same cause too. Then, a succession method of the stable sour kind from which it plants and activity does not change with splices easily was desired.

[0006]On the other hand, when growing lactic acid bacteria for sour kinds in pure culture, there is complicatedness of having to prepare a special nutrient medium by a strain. Although several sorts are known by nutrient medium of Lactobacillus San Francisco used, for example as lactic acid bacteria for sour kinds, it has a fault respectively. In a SDB culture medium (for example, JP,S58-58070,B printing), although FYE (fresh yeast extract) is required, this preparation work may take time and effort, and a difference may arise in the amount of growth of lactic acid bacteria also according to a kind of cake yeast moreover used as a raw material of FYE. In a nutrient medium (for example, JP,S62-31907,B printing) which uses L-cysteine as substitution of FYE, it is pointed out that the growth effect has a difference by a strain (for example, JP,H3-172171,A printing). Although an example which cultivated Lactobacillus San Francisco by a MYP culture medium is released (for example, JP,H3-58695,B printing), the amount of growth is not enough and suitable to aim at mass culture of a biomass. Then, a nutrient medium from which the amount of growth that culture-medium preparation is easy and good is obtained was desired.

[0007]It aims at providing a nutrient medium from which the amount of growth that culture-medium preparation is easy and good is obtained, while providing an adjustment method of a stable sour kind which it succeeded in this invention in view of the above-mentioned point, and plants it and from which activity does not change with splices easily.

[0008]

[Means for solving problem]In order to attain such a purpose, the preparing method of the sour kind of this invention, When inoculating the lactic acid bacteria for sour kinds into farina culture media, such as wheat flour, and preparing a sour kind, both acetic acid, and both [any one sort or / these] are added so that it may become 0.15 to 0.40weight % as acetic acid content of initiation to a farina culture medium.

[0009]It adds so that it may become 0.15 to 0.40weight % to farina culture media, such as wheat flour, as acetic acid content to a farina culture medium in both acetic acid, and both [any one sort or / these], When inoculate the lactic acid bacteria for sour kinds, seed revitalization of a sour kind is carried out, it plants, inherits and carries out using this sour kind of part and the passage of the culture is repeated and carried out, It plants, and for every splice, both acetic acid, and both [any one sort or / these] are added so that it may become 0.15 to 0.40weight % as acetic acid content to the farina culture medium of initiation.

[0010]When adding acetic acid or sodium acetate to a farina culture medium, also in any of the seed revitalization of a sour kind, and the subculture plant and according to a splice, 0.15 to 0.40 weight % is added on the basis of the whole (weight having contained acetic acid, such as wheat flour, water, and salt, and sodium acetate) farina culture medium of initiation. At the time of subculture, it is a numerical value on the basis of the whole (weight having contained acetic acid and sodium acetate) passage culture medium including some front sour kinds.

[0011]In the nutrient medium of the lactic acid bacteria for sour kinds used when growing the lactic acid bacteria for sour kinds for inoculating the nutrient medium of this invention into a sour kind in pure culture, It has composition which carries out a dried yeast extract one to 2weight %, makes both 5 ppm - 100 ppm, acetic acid, and both [any one sort or / these] acetic acid content for manganese per weight of a culture medium, and contains 0.05 to 0.40weight % of at least three ingredients.

[0012]Namely, when this invention makes the farina culture medium contain beforehand both acetic acid, and both [any one sort or / these] in preparation of a sour kind at the time of preparation of a sour kind or subculture, In pure culture of the lactic acid bacteria for sour kinds which a sour kind plants, attain quality stabilization at the time of a splice, and are used for this, Good growth is obtained by using the nutrient medium which combines both acetic acid, and both [any one sort or / these] with other essential nutrients, and uses them.

[0013]

[Function]According to the preparing method of the sour kind of this invention and the nutrient medium of the lactic acid bacteria for sour kinds which consist of such composition. By planting at the preparation time, adding both acetic acid, and both [any one sort or / these] at the time of a splice, so that it may become 0.15 to 0.40weight % of content

as acetic acid to a farina culture medium, and adjusting initiation pH to the five neighborhoods, ** Pull out intentionally three effects of pH buffer disposition top ** of the improvement in growth activity of the lactic acid bacteria for sour kinds, prevention of ** saprophytic-bacteria contamination, and ** sour kind simultaneously, and give preparation of a sour kind and the method of subculture stable by this. The nutrient medium of pure culture of the lactic acid bacteria for sour kinds used for the sour kind is also given. The details are given below.

[0014]

(1) With activity improvement sodium acetate of the lactic acid bacteria which constitute a sour kind. The growth. It is known for many years that many *Lactobacillus* lactic acid bacteria stimulated exist (Rogosa and Man). (Guirard, Snell and Williams: Arch. Biochem. 9, p361-1946) Sharpe: J. appl. Bact. 23 (1), p130-1960. As a result of collecting various kinds of lactic acid bacteria for sour kinds and inquiring wholeheartedly, this invention persons made the sour kind ferment, and found out that all the lactic acid bacteria for sour kinds that can have in manufacture of good sour breads and can be carried out growth promotion by existence of acetic acid. Although effective acetic acid concentration changes also with presentations of a strain or a nutrient medium, When it is in 0.05 to 0.40 weight % of the range in general as acetic acid content in a nutrient medium, and a good result is obtained and the lactic acid bacteria for sour kinds are actually grown in pure culture, the growth promotion effect can be checked by making a nutrient medium contain acetic acid of one of these concentration. If acetic acid is added so that it may become the above-mentioned concentration to a sour kind, growth of the lactic acid bacteria for sour kinds can be promoted in a sour kind. Addition of both acetic acid to the sour kind by this invention, and both [any one sort or / these] is based on the Reason first based on the above knowledge the 1st.

[0015] When cultivating the bacillus concerned and cultivating in a sour kind also in pure culture, it is required to be pH suitable at the time of the start of the growth and fermentation. It does not matter in order to adjust initiation pH, even if it uses any of acetic acid or sodium acetate and uses both together again. For example, when preparing a sour kind, the growth stimulative effect to the lactic acid bacteria for sour kinds can be obtained by adding combining acetic acid and sodium acetate so that initiation pH may become the five neighborhoods so that the content as acetic acid may become the concentration of the range which does not exceed 0.4%.

[0016] (2) Control of saprophytic bacteria is mentioned as the 2nd advantage that adds both control, next acetic acid of saprophytic bacteria, and both [any one sort or / these] as a sour species. acetic acid -- antibacterial activity -- strong -- from ancient times -- or -- it has been used as preservatives of ***** . Although fermentation is generally performed from the 4.5 to initiation pH 5.0 neighborhood as for a sour kind, since acetic acid has a dissociation constant of electric dissociation exponent=4.56 (25 **), if the sour kind is made to contain acetic acid, according to the pH decrease accompanying fermentation, the ratio of the un-dissociating type molecule will increase, and antibacterial activity will also increase.

[0017] The addition to the sour kind of acetic acid must have that it is not [range / which does not check the activity of the lactic acid bacteria which perform sour kind fermentation]. It became clear that the acetic acid content concentration which can expect the saprophytic-bacteria depressor effect of a sour kind at least by this invention, and can hold growth activity with high lactic acid bacteria for sour kinds was 0.15 to 0.40 weight %. for example, -- specifically receiving the sour kind whole quantity in acetic acid -- 0.3 weight % -- concentration -- it adding like and, The resistance force to saprophytic-bacteria contamination can be substantially raised rather than an acetic acid additive-free division by transposing some or all of acetic acid to sodium acetate, and tuning fermentation initiation pH finely to the five neighborhoods by sodium hydroxide etc. if needed further.

[0018] (3) pH buffer nature of a sour kind is improvable as the 3rd advantage that adds both improvement acetic acid of pH buffer nature, and both [any one sort or / these] as a sour species. The improvement of pH buffer nature is effective when it is going to manufacture a sour kind especially to water with a liquid type with a small ratio of the amount of the wheat flour used. Since pH buffer nature is low compared with a sponge kind etc. in the case of a liquid type, while the fermentation process of a sour kind of accumulation of metabolite according [reach / too much / early] to fermentation has been insufficient for boundary-zones-of-distribution pH (3.8-4.0) of lactic acid bacteria, the end of fermentation will be carried out. This also serves as a main cause to which the shortage of flavor of a bread and by extension, the performance of a sour kind become unstable. Considering it as the buffer for pH for sour liquid types also having the effect of (1) and (2), use of acetic acid and sodium acetate gives a good result. pH buffer nature almost equivalent to a sponge kind is obtained by using sodium acetate as acetic acid and making it contain about 0.15 to

0.2weight % as an example of use to a total of 100% of sour liquid type which contains 25% of 75% of water wheat flour, for example.

[0019]

[Working example]Hereafter, based on an accompanying drawing, the working example of this invention is described in detail.

[0020]Lactic-acid-bacteria *Lactobacillus San Francisco* for sour kinds: (Working example 1) Sodium acetate was added to the nutrient medium using 27651 shares of *Lactobacillus sanfrancisco* ATCC, and 27653 shares of ATCC(s), and the growth promotion effect in pure culture was checked. carrying out subculture of each biomass first by the publicly known SDB liquid medium (FYE, i.e., a fresh yeast extract, is made into solid content, and they are 0.5% content and JP,58-58070,B) -- the logarithmic growth phase last stage -- centrifugal separation -- a harvest -- it washed and re-suspended to sterile distilled water. As such lactic-acid-bacteria suspension was shown in drawing 1 so that it may be set to 2×10^6 cells/ml, each nutrient medium was inoculated, standing culture was carried out at 27 **, and the amount of growth was measured temporally. The amount of growth was performed with the general approach which measures 600-nm OD (Optical Density) by considering each culture medium which does not inoculate lactic acid bacteria as contrast (standard). The result of 27651 shares of ATCC(s) is shown in drawing 2.

[0021]As shown in drawing 2, growth of *Lactobacillus San Francisco* ATCC27651 in the examination culture medium c was quicker than any of a basal medium, the examination culture medium a, and the examination culture medium b, and the growth promotion effect of sodium acetate was checked. Same result is brought also when 27653 shares of ATCC(s) are used.

[0022]A place which added acetic acid in 0.05 to 0.70weight % of the range to the sodium acetate additive-free above-mentioned examination culture medium b, and examined the growth promotion effect to a strain of each above as initiation pH5.6, When acetic acid was added so that it may become concentration 0.05 to 0.40weight %, growth more than the examination culture medium b considered as contrast was accepted. The same result is brought even if it adds so that it may become the concentration by using sodium acetate as acetic acid instead of acetic acid, and it adjusts to culture-medium initiation pH5.6.

[0023](Working example 2) Although a fresh yeast extract is the essential ingredient in culture of *Lactobacillus San Francisco* as a supplementary item derived from an working example 1, By using a commercial dried yeast extract instead of a fresh yeast extract, and using manganese sulfate and sodium acetate together, it was equivalent to a case where a fresh yeast extract is used, or it became clear that growth beyond it could be given. The examination culture medium c of an working example 1 was improved, and it was considered as the examination culture medium d, and by the same strain and method as an working example 1, as shown in drawing 3, growth was compared with other nutrient media (a SDB culture medium, a cystein additive area, a MYP culture medium). A result of ATCC27651 is shown in drawing 4.

[0024]As shown in drawing 4, in the examination culture medium d, *Lactobacillus San Francisco* showed growth good most early. In the nutrient medium which added cystein instead of sodium acetate, it was less than the examination culture medium d at the growth speed. Since the amount of yeast extracts is liable to insufficient, a MYP culture medium in particular is not suitable as a culture medium for proliferating a biomass so much. Also when ATCC27653 is used, almost same result is brought.

[0025](Working example 3) After checking that *Lactobacillus San Francisco* carried out growth promotion by existence of acetic acid in the nutrient medium of pure culture or sodium acetate next, the sour kind was prepared using this culture object. a strain -- *Lactobacillus San Francisco* -- it lives together with 27651 shares of *Lactobacillus sanfrancisco* ATCC, and this, and a sour kind can be fermented -- yeast *Candida MIRERI*:*Candida. milleri* ATCC60590 was used. *Lactobacillus San Francisco* was inoculated so that it might become the examination culture medium d of the working example 2 with 10^7 cells/ml, and it shook or spin-cultured at 27 ** for 14 to 16 hours. Yeast *Candida MIRERI* carried out 1 platinum-loop inoculation per 100 ml of YPG culture media (1% of a yeast extract is included peptone 2% glucose 2%), and shaking culture was carried out 27 ** for 18 to 24 hours. These were inoculated into the wheat flour culture medium according to the formula shown in drawing 5 after a harvest and washing by centrifugal separation. To the experimental plot of this invention, it added so that the addition of sodium acetate and acetic acid might exceed a total of 0.15% as acetic acid. According to the formula which is fermented at 27 ** by making this into the sour kind I for 8 hours, continuing stirring so that wheat flour may not sediment, next is kept to

a 12 ** thermostatic chamber for 16 hours, and is shown in drawing 6 after a total of 24-hour progress, it planted and the splice was performed. It preservation [fermentation and] - Planted like the following by having made this into the sour kind II, and the splice was repeated. At this time, by the experimental plot, it has added so that it may plant and may become 0.15 weight % or more by making sodium acetate into acetic acid content for every patch.

[0026]Whenever it carries out the passage of the sour kind in this process, plant after ending fermentation and preservation and a sampling is performed from the sour kind in front of a splice, Number of microorganism is measured from a colony about what more than 10^3 cells appears the number of lactic acid bacteria per 1 g of sour kinds using SDB (0.5% of FYE solid content content) plate agar by YM plate agar in the number of yeast fungi as for, After centrifuging the sour kind for 10 minutes at 8000 rpm and filtering this supernatant liquid with a 0.45-micron deproteinization filter, component analysis was conducted with high performance chromatography. A result is shown in drawing 7 and drawing 8.

[0027]Also in [from drawing 7, a sour kind plants in process of the subculture of a sour kind, and] which stage after splice preservation, The number of microorganism of *Lactobacillus San Francisco* of the experimental plot of this invention was always increasing by 3 to 5 times the control plot, and the saprophytic bacteria A increased henceforth [the sour kind IV] at the control plot, and saprophytic-bacteria contamination was not seen by an experimental plot to the sour smell having also disappeared and the unpleasant wheat flour smell having become strong with it. Although strain *Lactobacillus San Francisco* used by the exam forms the colony of the letter of upheaval white on SDB plate agar, Since the saprophytic bacteria A form a little flat colony which has a transparent feeling by the culture medium, also grow YM plate agar for yeast further and build a colony quite smaller than yeast *Candida MIRERI*, they are easily distinguishable. The saprophytic bacteria A are lactic acid bacteria as which growth will often be regarded regardless of the manufacturer of wheat flour if the water suspension thing of wheat flour is fermented under the acescence of the pH 5 neighborhood for a long time, *Lactobacillus Cong Hugh Sas* who this invention persons are distributed over the plant kingdom as a result of separation identification of this, and produces dextran from a shook sirloin: It has judged with *Lactobacillus confusus*. Although especially this is planted when it is going to manufacture a sour kind with a liquid type, and it has become the main deterioration causes of the sour kind at the time of a splice, growth of this bacillus can be controlled by addition use of sodium acetate.

[0028]Drawing 8 shows that the accumulated dose of fermentation metabolite is improving rather than the sour kind of a control plot by the sour species of the experimental plot of this invention. In the experimental plot, it has had desirable influence also on the fermentation metabolic turnover of the lactic acid bacteria for sour kinds by improving pH buffer nature.

[0029](Working example 4) The saprophytic bacteria A were separated from the SDB plate agar for the number Measurement Division of lactic acid bacteria of the working example 3, and the response of the growth to acetic acid was checked by pure culture. Acetic acid was gradually added by having made the examination culture medium b of the working example 1 into the basal medium, initiation pH was adjusted to 5.0 in 6N-HCl or NaOH, and growth was measured by the same method as the working example 1. The ratio of the amount of growth to this is shown in drawing 9 on the basis of the amount of growth 24 hours after from an acetic acid additive-free division. The growth of lactic-acid-bacteria *Lactobacillus San Francisco* [27651 shares of] ATCC for sour kinds improved by 0.05 to 0.40% of acetic acid addition, and they was in growth of the saprophytic bacteria A invaded and increased as a sour species with 0.15% or more of acetic acid.

[0030]

[Effect of the Invention]according to [as explained above] the preparing method of the sour kind of this invention -- the time of preparation of a sour kind -- or it planting and at the time of a splice. Since both acetic acid, and both [any one sort or / these] are added so that it may become 0.15 to 0.40weight % of content as acetic acid to a sour kind, While being able to aim at growth activity improvement in the lactic acid bacteria for sour kinds, prevention of saprophytic-bacteria contamination can be aimed at and improvement in pH buffer nature of a sour kind can be aimed at further. According to the nutrient medium of the lactic acid bacteria for sour kinds, good growth can be obtained by using the nutrient medium which combines both acetic acid, and both [any one sort or / these] with other essential nutrients, and uses them. Therefore, since the subculture of a sour kind is stable, sour kind bread-making which has readiness by low cost conventionally comes made by planting a sour kind and using it with a splice.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]It is a figure showing the composition of the examination culture medium concerning the working example 1 of this invention.

[Drawing 2]It is a graph which shows the amount of growth of Lactobacillus San Francisco temporally, and the growth promotion effect by sodium acetate addition is shown.

[Drawing 3]It is a figure showing the composition of the examination culture medium concerning the working example 2 of this invention.

[Drawing 4]It is a graph which shows the amount of growth of Lactobacillus San Francisco temporally, and comparison by various culture media is shown.

[Drawing 5]It is a figure showing the sour species composition for an examination concerning the working example 3 of this invention.

[Drawing 6]It is a figure showing the sour species composition for an examination concerning the working example 3 of this invention.

[Drawing 7]It is a figure showing change of the number of micro organisms in a sour kind.

[Drawing 8]It is a figure showing change of the ingredient in a sour kind.

[Drawing 9]It is a graph which shows the amount of growth 24 hours after Lactobacillus San Francisco and the saprophytic bacteria A, and what changed acetic acid concentration by initiation pH5.0 is shown.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-252937

(43)公開日 平成5年(1993)10月5日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/38		7236-4B		
A 2 1 D 8/04				
// (C 1 2 N 1/38				
C 1 2 R 1:225)				

審査請求 未請求 請求項の数3(全 11 頁)

(21)出願番号	特願平4-88221	(71)出願人	000178594 山崎製パン株式会社 東京都千代田区岩本町3丁目2番4号
(22)出願日	平成4年(1992)3月13日	(72)発明者	佐藤 信之 東京都東村山市久米川町1-53-1 山崎製パン 株式会社内
		(72)発明者	伊藤 誠 東京都東村山市久米川町1-53-1 山崎製パン 株式会社内
		(72)発明者	吉川 恵則 東京都千代田区岩本町3-2-4 山崎製パン株式会社内
		(74)代理人	弁理士 小林 十四雄 (外1名)

(54)【発明の名称】 サワー種の調製方法及びサワー種用乳酸菌の栄養培地

(57)【要約】

【目的】 サワー種の植え継ぎによって容易に活性が変化しない安定したサワー種の調整をするとともに、培地調製が容易で良好な増殖量が得られるようにする。

【構成】 サワー種用乳酸菌を小麦粉等の穀粉培地に接種してサワー種を調製する際に、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を穀粉培地に対して酢酸含有量として0.15~0.40重量%になるように添加する。また、このサワー種の一部を用いて植え継ぎし培養を繰り返して継代する際に、植え継ぎ毎に、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を添加する。更に、サワー種用乳酸菌の栄養培地において、培地の重量あたり乾燥酵母エキスを1~2重量%、マンガン5ppm~100ppm、ならびに酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を酢酸含有量として0.05~0.40重量%の、少なくとも3成分を含有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サワー種用乳酸菌を小麦粉等の穀粉培地に接種してサワー種を調製する際に、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を穀粉培地に対して初発の酢酸含有量として0.15～0.40重量%になるように添加してなるサワー種の調製方法。

【請求項2】 小麦粉等の穀粉培地に酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を穀粉培地に対して酢酸含有量として0.15～0.40重量%になるように添加し、サワー種用乳酸菌を接種してサワー種を調製し、このサワー種の一部を用いて植え継ぎし培養を繰り返して継代する際に、植え継ぎ毎に、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を穀粉培地に対して初発の酢酸含有量として0.15～0.40重量%になるように添加してなるサワー種の調製方法。

【請求項3】 サワー種に接種するためのサワー種用乳酸菌を純粋培養する際に用いるサワー種用乳酸菌の栄養培地において、培地の重量あたり乾燥酵母エキスを1～2重量%、マンガンを含5ppm～100ppm、ならびに酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を酢酸含有量として0.05～0.40重量%の、少なくとも3成分を含有するサワー種用乳酸菌の栄養培地。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、製パン用サワー種の調製方法およびサワー種用乳酸菌の培養のためのサワー種用乳酸菌の栄養培地に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、パンの品質風味改良手段に多大な関心が寄せられ、そのための一手段としてサワー種の応用が考えられている。伝統的なサワー種製パン法では、小麦粉等の穀粉を用いた培地を用いてそれぞれの気候風土の中で自然に着生した乳酸菌や酵母等を濃密に増殖させ、これをパンの発酵種として利用してきた。このサワー種の継承は通常、サワー種の一部をもとにしてさらに小麦粉等の穀粉および水を加え、新たに発酵させるという植え継ぎ操作によっておこなわれる。

【0003】これらのサワー種の中で、微生物学的分析に基づいて特定の乳酸菌を純粋培養し、これを種おこしに用いるサワー種の製造例が知られている（例えば、特公昭57-39734号公報掲載）。また、一部の伝統的サワー種に乾燥・凍結乾燥等の処理をほどこし保存、流通を可能にすることがおこなわれ、ベーカリーはこれを利用してサワーブレッドの製造ができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、伝統的なサワー種は、各々の特定の地域でのみ安定した継承が可能であり、これを異なった地域で植え継いでいくとそ

のサワー種の本来の活性が失われるということが知られている。これは、それぞれのサワー種の発酵において主要な役割を担っている微生物とは別の、雑菌の侵襲を受けるため、気候風土が異なるとその環境における微生物相が異なることによる。

【0005】また、乳酸菌を純粋培養し、これを種おこしに用いることによって最初に調製するサワー種の安定性は向上させることができるが、植え継ぎを繰り返していくと、やはり同様の原因でサワー種の性質が最初とは異なってくる問題が生じ易い。そこで、植え継ぎによっても容易に活性が変化しない安定したサワー種の継承方法が望まれていた。

【0006】一方、サワー種用乳酸菌を純粋培養する場合、菌種によって特別な栄養培地を用意しなければならない等の煩雑さがある。また、例えばサワー種用乳酸菌として用いられるラクトバチルス・サンフランシスコの栄養培地には数種が知られているが各々欠点を有している。SDB培地（例えば、特公昭58-58070号公報掲載）ではFYE（新鮮酵母エキス）が必要であるがこの調製作業には手間がかかり、しかもFYEの原料として使用する生イーストの種類によっても乳酸菌の増殖量に相違が生じることがある。また、FYEの代替えとしてL-システインを使用する栄養培地（例えば、特公昭62-31907号公報掲載）では菌種によりその増殖効果に差があることが指摘されている（例えば、特開平3-172171号公報掲載）。さらに、MYP培地でラクトバチルス・サンフランシスコを培養した例が公表されているが（例えば、特公平3-58695号公報掲載）、増殖量が充分でなく、菌体の大量培養を目的にするには好適でない。そこで、培地調製が容易で良好な増殖量がえられる栄養培地が望まれていた。

【0007】本発明は上記の点に鑑みて為されたもので、植え継ぎによっても容易に活性が変化しない安定したサワー種の調整方法を提供するとともに、培地調製が容易で良好な増殖量がえられる栄養培地を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】このような目的を達成するため、本発明のサワー種の調製方法は、サワー種用乳酸菌を小麦粉等の穀粉培地に接種してサワー種を調製する際に、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を穀粉培地に対して初発の酢酸含有量として0.15～0.40重量%になるように添加してなるものである。

【0009】また、小麦粉等の穀粉培地に酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を穀粉培地に対して酢酸含有量として0.15～0.40重量%になるように添加し、サワー種用乳酸菌を接種してサワー種の種おこしをし、このサワー種の一部を用いて植え継ぎし培養を繰り返して継代する際に、植え継ぎ毎

に、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を初発の穀粉培地に対して酢酸含有量として0.15~0.40重量%になるように添加してなるものである。

【0010】酢酸または酢酸ナトリウムを穀粉培地に添加するときには、サワー種の種おこし及び植え継ぎによる継代培養のいずれにおいても、初発の穀粉培地の全体（小麦粉、水、食塩等、酢酸及び酢酸ナトリウムを含んだ重量）を基準にして0.15~0.40重量%を添加する。継代培養のときには、前のサワー種の一部を含めた継代培地の全体（酢酸及び酢酸ナトリウムを含んだ重量）を基準にしての数値である。

【0011】更に、本発明の栄養培地は、サワー種に接種するためのサワー種用乳酸菌を純粋培養する際に用いるサワー種用乳酸菌の栄養培地において、培地の重量あたり乾燥酵母エキスを1~2重量%、マンガンをも5ppm~100ppm、ならびに酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を酢酸含有量として0.05~0.40重量%の、少なくとも3成分を含有する構成としている。

【0012】即ち、本発明はサワー種の調製において、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を、サワー種の調製時もしくは継代培養時にあらかじめ穀粉培地に含有させておくことにより、サワー種の植え継ぎ時の品質安定化を図るものであり、また、これに使用するサワー種用乳酸菌の純粋培養において、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者をその他の必須栄養素と組み合わせ用いる栄養培地を用いることによって良好な増殖を得るものである。

【0013】

【作用】このような構成からなる本発明のサワー種の調製方法及びサワー種用乳酸菌の栄養培地によれば、調製時あるいは植え継ぎ時に酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者を穀粉培地に対し酢酸として0.15~0.40重量%の含有量になるように添加し、初発pHを5付近に調整することによって、①サワー種用乳酸菌の生育活性向上、②雑菌汚染の防止、③サワー種のpH緩衝性向上、の3つの効果を意図的に同時に引き出し、これによって安定したサワー種の調製と継代培養の方法を与えるものである。また、そのサワー種に用いるサワー種用乳酸菌の純粋培養の栄養培地をも与えるものである。以下にその詳細について述べる。

【0014】

(1) サワー種を構成する乳酸菌の活性向上
酢酸ナトリウムによってその生育を刺激されるラクトバチルス乳酸菌が数多く存在することは古くから知られている（Guirard, Snell and Williams: Arch. Biochem. 9, p361, 1946）（Man, Rogosa and Sharp: J. appl. Bact. 23 (1), p130,

1960）。本発明者らは各種のサワー種用乳酸菌を収集し鋭意検討した結果、サワー種を発酵せしめ良好なサワーブレッドの製造にもちいることができるサワー種用乳酸菌がすべて酢酸の存在によって生育促進することを見いだした。有効な酢酸濃度は菌種や栄養培地の組成によっても異なるが、栄養培地中に酢酸含有量としておおむね0.05~0.40重量%の範囲にある時に良好な結果が得られ、実際にサワー種用乳酸菌の純粋培養をおこなう際にこのいずれかの濃度の酢酸を栄養培地に含有させることによって生育促進効果を確認することができる。またサワー種へ上記濃度になるように酢酸の添加をおこなうと、サワー種中においてもサワー種用乳酸菌の生育を促進することができる。本発明によるところのサワー種への酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者の添加は、まず第1に以上の知見にもとづく理由によるものである。

【0015】当該菌を培養する際には純粋培養においてもサワー種の中で培養する場合においてもその生育や発酵の開始時に適切なpHになっていることが必要である。初発pHを調整するために酢酸または酢酸ナトリウムのいずれを用いてもまた両者を併用してもかまわない。例えばサワー種の調製をおこなう場合、酢酸としての含有量が0.4%を越えない範囲の濃度になるように、かつ初発pHが5付近になるように酢酸と酢酸ナトリウムを組み合わせ添加することによりサワー種用乳酸菌への生育刺激効果を得ることができる。

【0016】(2) 雑菌の抑制

次に酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者をサワー種に添加する第2の利点として雑菌の抑制が挙げられる。酢酸は抗菌力が強く古来から食品の保存料として使用されてきた。一般にサワー種は初発pH4.5~5.0付近から発酵がおこなわれるが、酢酸はpKa=4.56(25℃)の解離定数をもつため、サワー種に酢酸を含有させておくことと発酵にともなうpH低下にしたがってその非解離型分子の比率が増加し抗菌力も増大する。

【0017】酢酸のサワー種への添加はサワー種発酵をおこなう乳酸菌の活性を阻害しない範囲でなさなくてはならない。本発明により少なくともサワー種の雑菌抑制効果が期待でき、かつサワー種用乳酸菌が高い生育活性を保持できる酢酸含有濃度は0.15~0.40重量%であることが判明した。例えば具体的には、酢酸をサワー種全量に対し0.3重量%の濃度なるように添加し、また酢酸の一部または全部を酢酸ナトリウムに置き換え、さらに必要に応じて水酸化ナトリウム等で発酵初発pHを5付近に微調整することによって、酢酸無添加区よりも雑菌汚染に対する抵抗力を大幅に向上させることができる。

【0018】(3) pH緩衝性の改善

酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれら

の両者をサワー種に添加する第3の利点としてサワー種のpH緩衝性を改善することができる。pH緩衝性の改善は特に水に対して小麦粉使用量の比率が小さい液種でサワー種を製造しようとする場合に効果的である。液種の場合、スポンジ種等と比べてpH緩衝性が低いため、サワー種の発酵過程で乳酸菌の生育限界pH(3.8~4.0)に早く到達しすぎ、発酵による代謝産物の蓄積が不十分なまま発酵終了することになる。これはパンの風味不足やひいてはサワー種の性能が不安定になる主原因ともなる。(1)(2)の効果をも合わせ持つサ

【0019】

【実施例】以下、添付図面に基つて本発明の実施例について詳細に説明する。

【0020】(実施例1)サワー種用乳酸菌ラクトバチルス・サンフランシスコ:Lactobacillus sanfrancisco ATCC27651株およびATCC27653株を用い酢酸ナトリウムを栄養培地に添加して純粋培養における生育促進効果を確認した。まず公知のSDB液体培地(FYEすなわち新鮮酵母エキスを固形分として0.5%含有、特公昭58-58070号)で各菌体を継代培養しておき、対数増殖期末期に遠心分離により集菌、洗浄して滅菌蒸留水に再懸濁した。これらの乳酸菌懸濁液を 2×10^6 cells/mlになるように、図1に示すように、各栄養培地に接種して27℃で静置培養し、経時的にその生育量を測定した。生育量は乳酸菌を接種しないそれぞれの培地を対照(基準)として600nmのOD(Optical Density)を測定する一般的方法によりおこなった。ATCC27651株の結果を図2に示す。

【0021】図2に示すように、基本培地、試験培地a、試験培地bのいずれよりも試験培地cでのラクトバチルス・サンフランシスコATCC27651の生育が速く、また酢酸ナトリウムの生育促進効果が確認された。ATCC27653株を用いた場合にも同様の結果となる。

【0022】また、酢酸ナトリウム無添加の上記試験培地bに酢酸を0.05~0.70重量%の範囲で添加し初発pH5.6として上記それぞれの菌株への生育促進効果を試験したところ、酢酸を0.05~0.40重量%濃度になるように添加したときに、対照とする試験培地b以上の生育が認められた。なお酢酸のかわりに酢酸ナトリウムを酢酸として同濃度になるように添加し培地初発pH5.6に調整しても同じ結果となる。

【0023】(実施例2)実施例1から誘導される付帯

事項として、ラクトバチルス・サンフランシスコの培養においては新鮮酵母エキ스가その必須成分であるとされてきたが、新鮮酵母エキスの代わりに市販乾燥酵母エキスをういかつ硫酸マンガと酢酸ナトリウムを併用することによって新鮮酵母エキスをういた場合と同等かそれ以上の生育を与えることができることが判明した。実施例1の試験培地cを改良して試験培地dとし、実施例1と同様の菌株と方法で、図3に示すように、その他の栄養培地(SDB培地、システイン添加区、MYP培地)と生育の比較を行った。ATCC27651での結果を図4に示す。

【0024】図4に示すように、試験培地dにおいてラクトバチルス・サンフランシスコは最も早く良好な生育を示した。酢酸ナトリウムの代わりにシステインを添加した栄養培地ではその生育速度において試験培地dにおよばなかった。MYP培地は特に酵母エキス量が不足気味のため菌体を多量に増殖させる為の培地としては適さない。ATCC27653を用いた場合にもほぼ同様の結果となる。

【0025】(実施例3)ラクトバチルス・サンフランシスコが純粋培養の栄養培地中の酢酸または酢酸ナトリウムの存在によって生育促進することを確認したうえで、次に、この培養菌体を使用してサワー種の調製をおこなった。菌株はラクトバチルス・サンフランシスコ:Lactobacillus sanfrancisco ATCC27651株とこれと共生しサワー種の発酵をおこなうことができる酵母キャンディダ・ミレリ:Candida milleri ATCC60590を使用した。ラクトバチルス・サンフランシスコを実施例2の試験培地dに 10^7 cells/mlとなるように接種して27℃で14~16時間振盪または攪拌培養した。酵母キャンディダ・ミレリはYPG培地(グルコース2%、ペプトン2%、酵母エキス1%を含む)100mlにつき白金耳接種し、27℃、18~24時間振盪培養した。これらを遠心分離により集菌、洗浄後、図5に示す処方に従い、小麦粉培地に接種した。本発明の試験区には酢酸ナトリウムと酢酸の添加量が酢酸として合計0.15%を越えるように添加した。これをサワー種Iとして、小麦粉が沈降しないように攪拌を続けながら27℃で8時間発酵させ、次に、12℃の恒温室に16時間保管して合計24時間経過後、図6に示す処方に従い、植え継ぎをおこなった。これをサワー種IIとして以下同様に発酵・保存・植え継ぎの繰返しをおこなった。このとき、試験区では、植え継ぎごとに酢酸ナトリウムを酢酸含有量として0.15重量%以上となるように添加している。

【0026】この過程においてサワー種を継代する毎に、発酵・保存を終了後の植え継ぎ直前のサワー種からサンプリングをおこない、酵母菌数をYM平板培地で乳酸菌数をSDB(FYE固形分0.5%含有)平板培地

7

を用いてサワー種1グラムあたり 10^3 cells以上あらわれるものについてコロニーから菌数を計測し、またサワー種を8000rpmで10分間遠心分離しこの上清を0.45ミクロンの除タンパクフィルターでろ過した後、高速液体クロマトグラフィーによって成分分析をおこなった。結果を図7及び図8に示す。

【0027】図7から、サワー種の継代培養の過程でサワー種の植え継ぎ保存後のいずれの段階においても、本発明の試験区のラクトバチルス・サンフランシスコの菌数は常に対照区の3～5倍に増加しており、また、対照区ではサワー種IV以降で雑菌Aが増殖して、それとともにサワー臭も消失して不快な小麦粉臭が強くなったのに対し、試験区では雑菌汚染がみられなかった。本試験で使用了菌株ラクトバチルス・サンフランシスコはSDB平板培地上で白く隆起状のコロニーを形成するが、雑菌Aは同培地で透明感のあるやや扁平なコロニーを形成しさらに酵母用YM平板培地でも生育して酵母キャンディダ・ミレリよりもかなり小さいコロニーをつくるため容易に区別できる。雑菌Aは小麦粉の水懸濁物をpH5付近の弱酸性下で長時間発酵させると小麦粉の製造元

【0028】また、図8は、本発明の試験区のサワー種で対照区のサワー種よりも発酵代謝産物の蓄積量が向上していることをしめすものである。試験区ではpH緩衝性が改善されていることによって、サワー種用乳酸菌の発酵代謝にも好ましい影響を与えている。

【0029】(実施例4) 実施例3の乳酸菌数計測用SDB平板培地から雑菌Aを分離し、純粋培養によって酢酸に対する生育の応答を確認した。実施例1の試験培地bを基本培地として酢酸を段階的に添加し、6N-HClまたはNaOHにて初発pHを5.0に調整し実施例1と同じ方法で生育を測定した。酢酸無添加区の24時間後の生育量を基準にして、これに対する生育量の比率

8

を図9に示す。サワー種用乳酸菌ラクトバチルス・サンフランシスコATCC27651株は0.05～0.40%の酢酸添加により生育が向上し、サワー種に侵入して増殖する雑菌Aの生育は酢酸0.15%以上で遅れた。

【0030】

【発明の効果】以上説明したように、本発明のサワー種の調製方法によれば、サワー種の調製時あるいは植え継ぎ時に、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者をサワー種に対し酢酸として0.15～0.40重量%の含有量になるように添加するので、サワー種用乳酸菌の生育活性の向上を図ることができるとともに、雑菌汚染の防止を図ることができ、更に、サワー種のpH緩衝性の向上を図ることができる。また、サワー種用乳酸菌の栄養培地によれば、酢酸および酢酸ナトリウムのいずれか1種またはこれらの両者をその他の必須栄養素と組み合わせ用いる栄養培地を用いることによって良好な増殖を得ることができる。そのため、サワー種の継代培養が安定化するので、サワー種を植え継ぎながら使用することによって従来よりも低コストで即応性のあるサワー種製パンができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1に係る試験培地の構成を示す図である。

【図2】ラクトバチルス・サンフランシスコの生育量を経時的に示すグラフであり、酢酸ナトリウム添加による生育促進効果を示す。

【図3】本発明の実施例2に係る試験培地の構成を示す図である。

【図4】ラクトバチルス・サンフランシスコの生育量を経時的に示すグラフであり、各種培地での比較を示す。

【図5】本発明の実施例3に係る試験用サワー種組成を示す図である。

【図6】本発明の実施例3に係る試験用サワー種組成を示す図である。

【図7】サワー種中の生菌数の変化を示す図である。

【図8】サワー種中の成分の変化を示す図である。

【図9】ラクトバチルス・サンフランシスコと雑菌Aの24時間後の生育量を示すグラフであり、初発pH5.0で酢酸濃度を変えたものを示す。

【図1】

	基本培地	試験培地 a	試験培地 b	試験培地 c
アミノ酸	20g	20g	20g	20g
酵母エキス (Difco)	10g	10g	10g	10g
トリプチン (BBL)	6g	6g	6g	6g
Tween80	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	0.2g	0.2g	0.2g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	—	—	50mg	50mg
CH ₃ COONa·3H ₂ O	—	3.4g	—	3.4g
水	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml
6N-HClにて	pH5.6	pH5.6	pH5.6	pH5.6

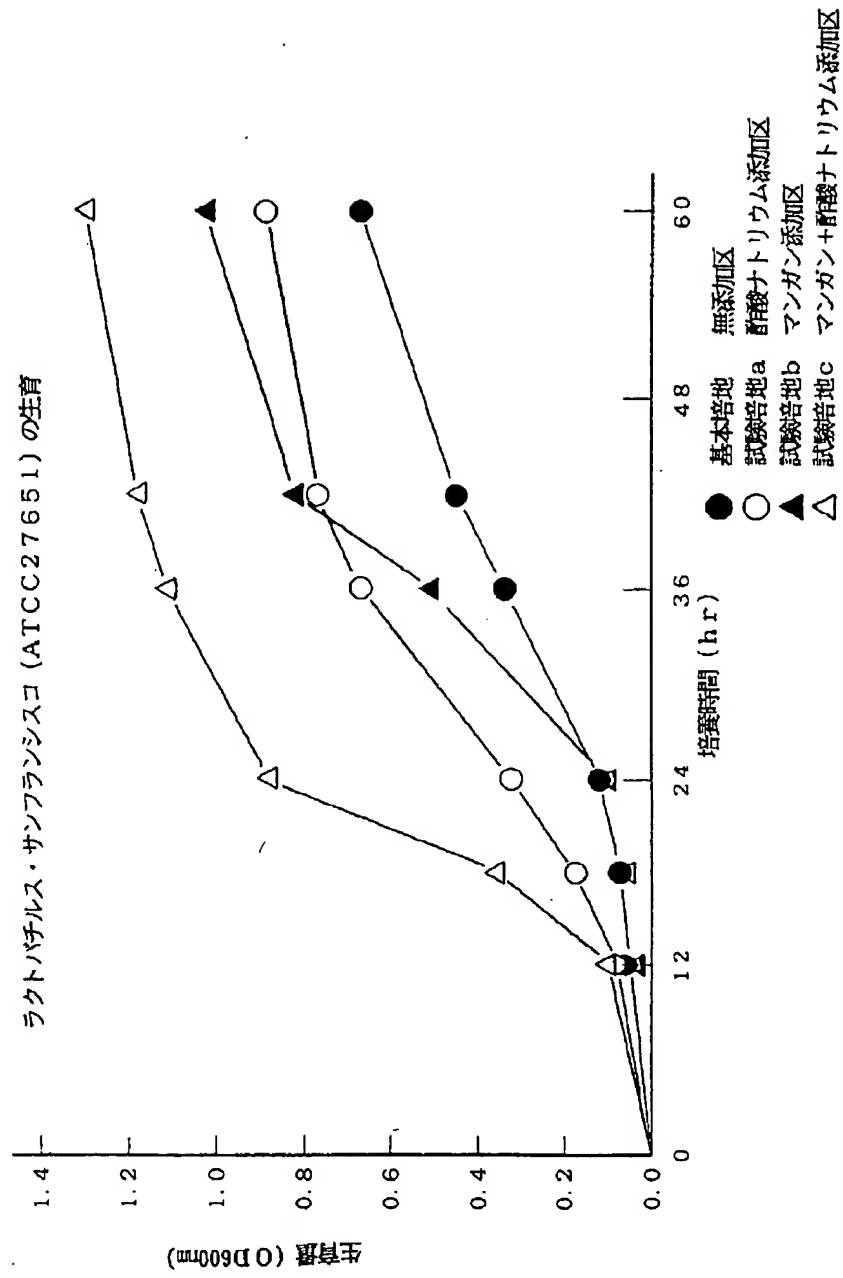
【図3】

(本発明)

	試験培地 d	SDB培地	システイン 添加区	MYP培地
アミノ酸	20g	20g	20g	10g
酵母エキス (Difco)	15g	3g	15g	5g
新鮮酵母エキス (FYE)	—	5~15g *	—	—
バクトペプトン (Difco)	10g	—	10g	5g
トリプチン (BBL)	—	6g	—	—
Tween80	0.25g	0.3g	0.25g	0.25g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	—	0.2g	0.1g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	50mg	—	50mg	5mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	—	5mg
NaCl	—	—	—	5mg
CH ₃ COONa·3H ₂ O	3.4g	—	—	1.0g
L-システイン	—	—	0.3g	—
グルタミン酸モノナトリウム	—	—	—	1g
水	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml
6N-HClにて	pH5.6	pH5.6	pH5.6	pH5.6

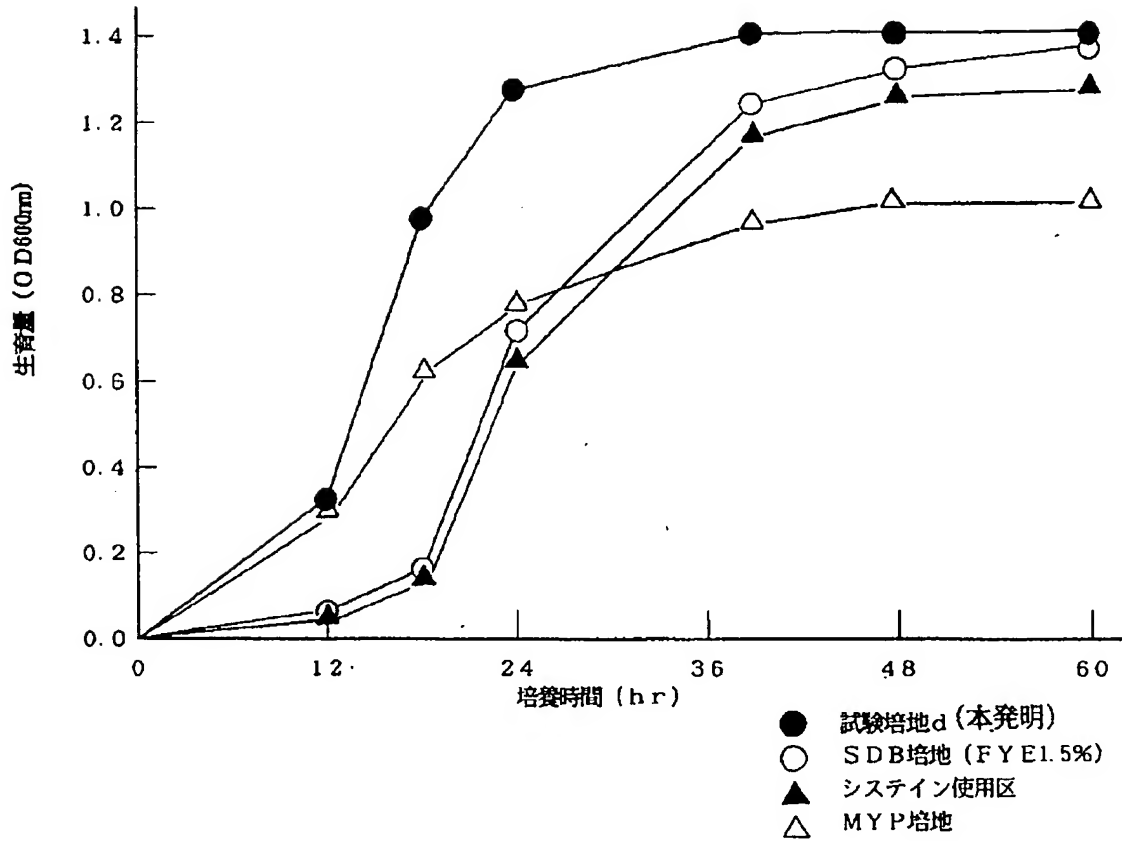
(表中*印は固形分として)

【図2】



【図4】

ラクトバチルス・サンフランシスコ (ATCC27651) の生育



【図5】

試験用サワー種組成 (種おこし: サワー種I)

	対照区	試験区 (本発明)
強力小麦粉	100 g	100 g
水	250 g	250 g
食塩	2 g	2 g
酢酸ナトリウム	—	0.65 g
酢酸	—	0.25 g
酵母キャンディ・ミリ	2×10^6 cells/g	2×10^6 cells/g
乳酸菌ラクトバチルス・サンフランシスコ	1×10^6 cells/g	1×10^6 cells/g
発酵開始pH	pH 5.0	pH 5.0
	(1~6N-HClにて調整)	

【図6】

試験用サワー種組成 (植え継ぎ種: サワー種Ⅱ以降)

	対照区	試験区 (本発明)
強力小麦粉	100 g	100 g
水	250 g	250 g
食塩	2 g	2 g
酢酸ナトリウム	—	1.2 g
前のサワー種	118 g	118 g
発酵開始 pH	pH5.0	pH5.0
(1~6N-HClまたはNaOHにて微調整)		

【図8】

サワー種中の成分の変化 (単位mg/100g サワー種)

	対照区				試験区（本発明）		
	サ-種	乳酸	酢酸	エタノ-ル	乳酸	酢酸	エタノ-ル
発酵開始	I	0.0	0.0	0.0	0.0	177.4	0.0
植継ぎ前	I	231.5	49.8	274.5	331.3	240.0	330.2
〃	II	281.6	44.1	371.9	436.5	241.7	433.5
〃	III	303.3	45.3	409.3	503.6	251.5	463.7
〃	IV	305.6	50.4	409.8	494.4	249.7	462.8
〃	V	323.8	54.4	408.4	506.4	246.3	467.3
〃	VI	378.1	51.5	392.7	490.3	260.4	443.0
〃	VII	434.8	65.4	411.2	505.7	274.8	474.8

サワー種中の生菌数の変化 (単位: 菌数/g サワー種)

サワー種	対照区				試験区 (本発明)			
	PH	酵母菌数	乳酸菌数	雑菌A	PH	酵母菌数	乳酸菌数	雑菌A
I	3.82	2.1×10^7	1.4×10^6	ND	4.11	2.0×10^7	3.4×10^8	ND
II	3.93	3.2×10^7	9.0×10^7	ND	4.12	2.2×10^7	3.3×10^8	ND
III	3.88	2.9×10^7	8.7×10^7	ND	4.10	1.5×10^7	4.0×10^8	ND
IV	3.90	2.8×10^7	1.1×10^8	2.6×10^8	4.13	1.6×10^7	4.2×10^8	ND
V	3.90	3.1×10^7	1.8×10^8	4.8×10^7	4.11	1.5×10^7	4.2×10^8	ND
VI	3.76	1.8×10^7	7.4×10^7	1.8×10^8	4.12	1.6×10^7	4.4×10^8	ND
VII	3.76	2.1×10^7	9.6×10^7	4.2×10^8	4.10	1.5×10^7	5.0×10^8	ND

ND: 検出されず

【図7】

(10)

【図9】

